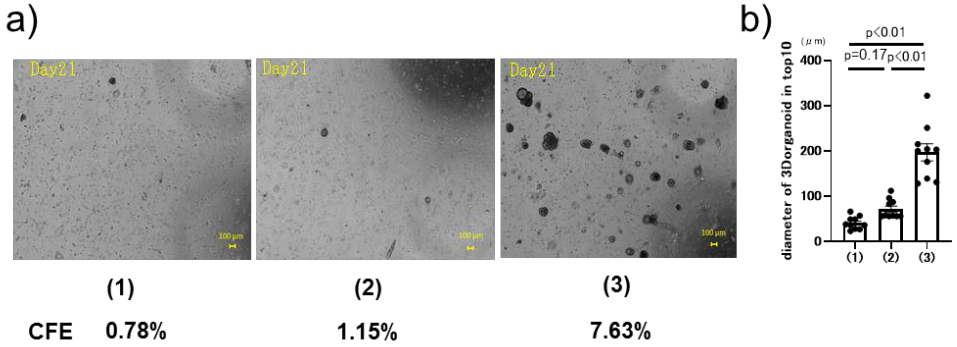
56　II型肺胞上皮細胞の組織幹細胞としての不均一性の解明	荒屋　潤

【目的】II型肺胞上皮細胞（AT2）はI型肺胞細胞に分化しうる組織幹細胞であり、肺胞構造及び機能の恒常性維持で最も重要な細胞である。慢性閉塞性肺疾患（COPD）で、AT2における細胞死、細胞老化、治癒過程での機能異常などが病態進展に関与する可能性は過去に報告されている。AT2は不均一な表現型の細胞集団である可能性があり、表現型の変化や幹細胞性低下がCOPD病態進展に関与する可能性がある。さらにAT2表現型不均一性の相違がCOPD病態における肺気腫及び細気道病変の混在における多様性の原因となる可能性もあるが、その不均一性の詳細は解明されていない。近年のsingle-cell transcriptomic analysis手法の確立により、個々の細胞における遺伝子発現の違いをベースにしたcell clusteringにより、様々な病態に関与する新規細胞集団が同定されている。肺から分離したAT2のみにfocusしたsingle-cell transcriptomic analysisによりAT2の表現型や組織幹細胞の不均一性を明らかにすることは、COPD病態を理解する上での重要な知見となる可能性がある。AT2の表現型不均一性や、その機能評価をするためには、患者肺由来AT2の大量培養系の確立が必要である。近年、肺組織から分離したAT2としての形質を維持しながら増殖可能な、3次元培養系がいくつか報告されている。そこで、より効率的にAT2の増殖が可能な3次元培養系を確立し、正常、COPD肺組織から分離したAT2を3次元培養系で増殖させた上で、single-cell transcriptomic analysisを行うことを目的とした検討を行うこととした。AT2のstemnessを含む表現型不均一性を評価し、COPD病態進展に、より特異的に関与するAT2のcell clusterを同定し、さらに細胞死や細胞老化の制御機構で、COPD病態変化に関与が報告されている蛋白恒常性維持機構能の役割を明らかにすることを最終的な目的とする。

【方法】手術肺検体からLung Dissociation Kitを使用しsingle cell suspensionを作製した。CD45microbeadsを用いて血球成分を除去し、AT2マーカーであるEPCAMとHT2-280を用いて、両者の陽性細胞をcell sorterにて回収した。細胞懸濁液とマトリゲルを混合し3Dドーム構造を形成し、マトリゲルを固形化してから培地を投与し3次元培養を行った。3Dドーム構造を形成するヒトAT2の3次元培養系の報告は過去に3報あり、より効率的な増殖が得られるmedium、inhibitor、growth factorの組み合わせを、それらの報告をもとにして検討した。1. 培地にSAGMを使用し3日毎にmedium交換し、マトリゲルにJagged-1を加えた方法、2. 培地にAdvanced DMEM/F-12を使用し3日毎にmedium交換し、Nicotinamideなどを添加した方法、3. 培地にAdvanced DMEM/F-12を使用し3日毎にmedium交換し、多種のinhibitor、growth factorを添加した方法を比較検討した。

【結果】三つの培養法すべてでAT2増殖が得られたが、3. の方法が他と比較し有意差をもって、AT2の形態を維持しながら最も効率的な細胞増殖が得られた（培養開始21日目の10個のオルガノイド径、細胞増殖が得られた比率（colony-forming efficiency：CFE）にて評価）。以上より、3. の方法が、より増殖能がある患者肺由来のAT2の3次元培養系として有用である結果を得た。

3種類のオルガノイド3次元培養法の比較（day21評価）



56. Ⅱ型肺胞上皮細胞の組織幹細胞としての不均一性の解明

荒屋　潤

東京慈恵会医科大学 内科学講座 呼吸器内科

Key words：Ⅱ型肺胞上皮細胞，3 次元培養，オルガノイド，慢性閉塞性肺疾患

緒　言

肺胞上皮細胞は肺胞内腔を覆っており、肺胞壁の約 95%を占める扁平な I 型肺胞上皮細胞（AT1）はガス交換を行い、約 5%を占める立方形の II 型肺胞上皮細胞（AT2）は肺胞表面活性物質のサーファクタント産生によって肺の虚脱を防いでいる。AT2 は増殖能を持ち、幹細胞としての stemness を含め不均一な表現型の細胞集団であり、加齢に伴い発症する呼吸器疾患である慢性閉塞性肺疾患（COPD）において、AT2 でのオートファジーなど蛋白恒常性維持機構の破綻と、それに伴うアポトーシスやネクロトーシスといった細胞死、細胞老化の亢進、さらに治癒過程における機能異常などが病態進展に関与する可能性は過去に示されている。AT2 の表現型不均一性の変化や stemness の低下が病態進展に関与する可能性はあるが、その詳細は解明されていない。近年の single-cell transcriptomic analysis 手法の確立により、個々の細胞における遺伝子発現の違いによる cell clustering を用いた表現型の詳細な評価が可能となり、様々な病態に関与する新規細胞集団が同定されている。患者由来の肺から分離した AT2 を用いた single-cell transcriptomic analysis により COPD 病態を反映する形で、生理的な AT2 の不均一性を細胞内恒常維持機構、細胞老化、stemness の点から明らかにすることは、病態を理解する上での重要な知見となる。AT2 の不均一性の機序の詳細を十分に検討するには、AT2 の大量培養系が必要になる。近年、肺組織から AT2 を分離し、AT2 の形質を維持しながら細胞増殖が可能なオルガノイド 3 次元培養系の存在が報告されている。そこで AT2 の stemness を含む表現型不均一性を評価するため、3D ドーム構造を形成する 3 次元培養系に single-cell transcriptomic analysis を組み合わせた検討を行う方針とした。3D ドーム構造による 3 次元培養系に関して、これまで複数の阻害剤や growth factor を組み合わせた方法がいくつか報告されているが、それぞれの方法の比較検討は行われていない。そこでまずは最も効率的に AT2 増殖が得られる 3 次元培養方法を見出し、肺組織からプライマリーAT2 の培養系を確立することを本研究の目的とした。

方　法

1. 肺組織から分離したⅡ型肺胞上皮細胞の 3D ドーム構造による 3 次元培養法

手術末梢肺検体から胸膜を剥離した後、肺組織を数 mm 程度まで細かくなるように処理した。その後、Lung Dissociation Kit、mouse の溶液内に検体を入れ、gentle MACS dissociator を使用し 37℃、42 分間反応させ、single cell suspension を作製した。フィルターを通し、RBC lysis buffer にて赤血球除去し、CD45microbeads、LS columns、MACS separator を用いて血球成分を除去した。血球成分を除去した single cell suspension を MACS buffer（PBS＋0.5% BSA＋2 mM EDTA）で溶解し、上皮細胞マーカーEPCAM と AT2 に特異度の高いモノクローナル抗体 HT2-280 にて蛍光標識した AT2 細胞分画を cell sorter にて回収した。3D ドーム構造の作製は、medium 35 μl に回収した AT2 細胞を懸濁し、マトリゲル 35 μl（細胞懸濁液：マトリゲル＝1：1）を混合し、計 70 μl の懸濁液を作製して、24 well dish の中心に 3D ドームを作製した。37℃で 20 分間、CO2 インキュベーター内でマトリゲルを固形化した後、それぞれの Medium を 500 μl 投与し培養を開始した（図 1）。

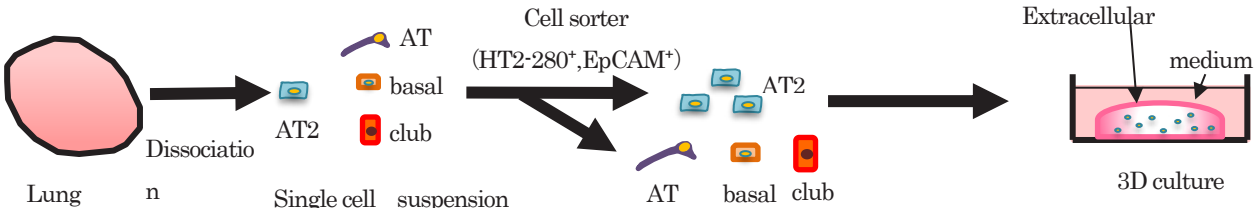


図 1. 肺組織からⅡ型肺胞上皮細胞を分離して回収、3D ドーム構造による 3 次元培養までの流れ

2. 3D ドーム構造による 3 次元培養法の培養液の違い

肺組織から AT2 を分離し、3D ドーム構造による 3 次元培養を施行した過去の 3 つの報告から、より効率的に増殖が得られる Medium、Inhibitor、Growth factor の組み合わせを検討した［1～3］。患者検体から分離し回収した AT2 を 3 等分にし、計 70μl の懸濁液（細胞懸濁液：マトリゲル＝1：1）にて 3D ドームを作製した。(1) SAGM を Medium に使用し 3 日毎に medium 交換する方法［1］、(2) Advanced DMEM/F-12 を Medium に使用し 3 日毎に medium 交換する方法［2］、(3) Advanced DMEM/F-12 を Medium に使用し 2 日毎に medium 交換する方法［3］（表 1）について、21 日目における 10 個の平均オルガノイド径の大きさと colony-forming efficiency（CFE、細胞増殖が得られた細胞比率）を計測することにより、増殖能を評価した。オルガノイド径は dish 内の大きいオルガノイドから 10 個を測定し、平均値を計算した。CFE に関しては、オルガノイド形成した細胞数と seeding した AT2 細胞数の比率で算出した。

表 1. 各培養法の Medium、Inhibitor、Growth factor などの違い

	(1)			(2)			(3)		
Medium	SAGM (except epinephrine)			Advanced DMEM/F-12			Advanced DMEM/F-12		
	Name	Dose	Period	Name	Dose	Period	Name	Dose	Period
Inhibitor	CHIR99021	3 μM	all	A83-01	500 nM	all	BIRB796	1 μM	all
	Noggin	100 ng/ml	all	Noggin	100 ng/ml	all	CHIR99021	3 μM	all
	SB431542	10 μM	all				DMH-1	1 μM	all
	Y-27632	10 μM	0-3days				SB431542	10 μM	all
							Noggin	10 ng/ml	all
							Y-27632	10 μM	0-4days
Growth Factor	Human FGF-7	100 ng/ml	all	Human EGF	50 ng/ml	all	Human EGF	50 ng/ml	all
							Mouse FGF-10	10 ng/ml	all
Others	Jagged-1	1 μM	mixed with matrigel	B-27 supplement	1×	all	Antibiotic -Antimycotic	1×	all
				GlutaMAX-1	1×	all	B-27 supplement	1×	all
				HEPES	1 mM	all	GlutaMAX-1	1×	all
				N-acetylcysteine	1 mM	all	Heparin	5 μg/ml	all
				Nicotinamide	10 mM	all	HEPES	15 mM	all
				Pen/Strep Glutamine	1×	all	mouse IL-1β	10 ng/ml	0-8days
							N-acetylcysteine	1.25 mM	all

使用している Medium、Inhibitor、Growth factor、その他の培養液に使用している製剤の濃度、使用期間を記載。

（FGF：Fibroblast Growth factor、EGF：Epidermal Growth factor）

3. 増殖したⅡ型肺胞上皮細胞の形態評価

3D ドーム構造による 3 次元培養法で増殖が得られた細胞を、day28～42 の間にマトリゲルごと回収した。PBS-EDTA にて細胞を分離させ、トリプシン処理を施行した。マトリゲルを溶解した後、FCS を含む Medium にてトリプシンを不活化し、遠心して細胞ペレットを得た。ペレットを数μl の medium で懸濁し、smear gel を用いてスライド上に得られた細胞を撹拌した。細胞を固定し、AT2 マーカーである SFTPC と HT2-280 の蛍光免疫染色を施行した。電動オールインワン顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡にて染色性を評価した。

結　果

1.　Ⅱ型肺胞上皮細胞の 3D ドーム構造による 3 次元培養

分離回収した AT2 を 3D ドーム構造による 3 次元培養を用いて培養開始した。(1) ～ (3) のすべての方法でオルガノイド形成を認め、経時的な細胞増殖が得られた。検体毎に増殖能に差を認めたが、年齢、切除部位、疾患など患者背景の増殖能への影響に関して、検討範囲内では一定の傾向を認められなかった。

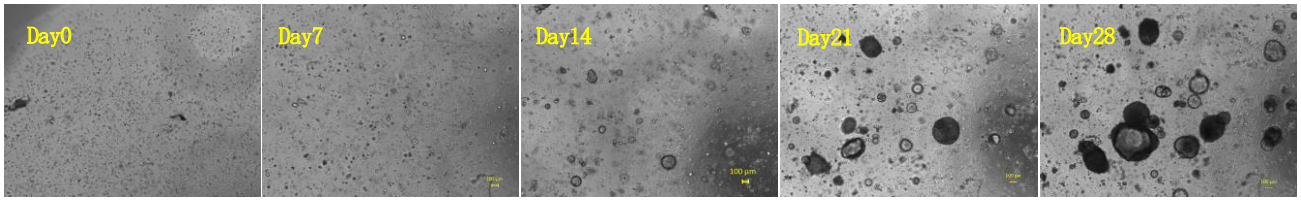


図 2.　Ⅱ型肺胞上皮細胞の増殖経過の一例

3. の方法を用いた3次元培養。オルガノイド形成し細胞増殖認める（倍率×4、スケールバー：100μm）。

2.　増殖した細胞の形態学的評価

3 次元培養にて増殖したオルガノイドを day28～42 の間に回収し、蛍光免疫染色を施行し形態学的に評価した。細胞集団を立体的に形成しており、細胞膜に存在する HT2-280、細胞質に存在する SFTPC がすべての細胞で染色され、AT2 の形態を維持して細胞増殖していることを確認した。(1) ～ (3) のすべての方法で同様な結果を得た。

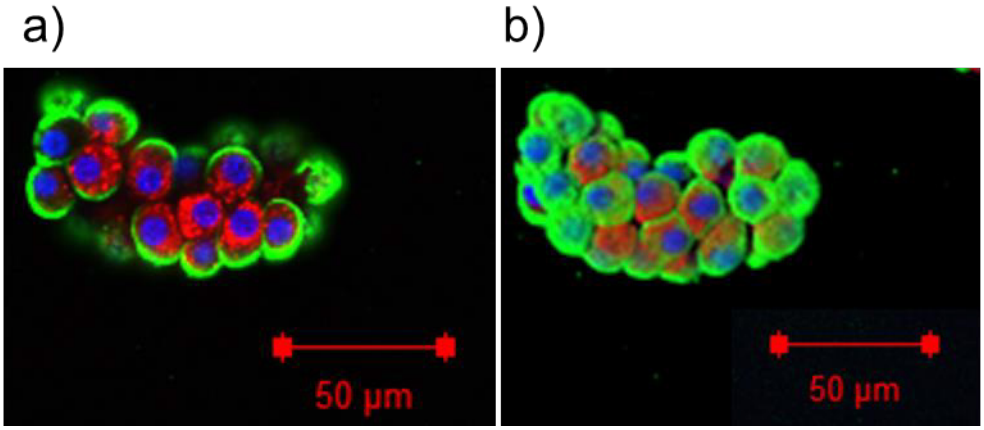


図 3.　3 次元培養にて増殖したオルガノイドの蛍光免疫染色

共焦点レーザー顕微鏡による観察。緑：HT2-280、赤：SFTPC、青：Hoechst33342

（倍率×40、スケールバー：50μm）。

a）通常の撮影画像。

b）Z-Stackで撮影した3D画像。

3.　複数の培養方法による増殖能の評価

同一検体で同じ細胞数の 3D ドーム構造による 3 次元培養を用いて、(1) ～ (3) の方法による増殖能を比較検討した。すべての培養法で AT2 の増殖は得られたが、(3) の方法がオルガノイドの平均径、CFE において他の方法と比較し有意差をもって効率的な細胞増殖が得られた。以上の結果から (3) の方法が、より増殖能が高く AT2 の 3 次元培養系であることが明らかとなった。

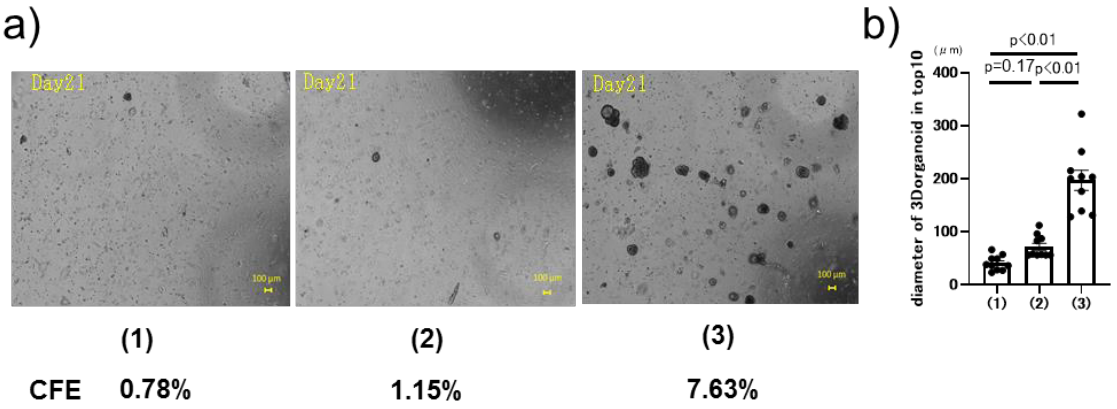


図 4. 3 つの培養方法による細胞増殖能の比較

Day21時点でのオルガノイド径及びCFEの比較。

a）（1）～（3）の 3 次元培養の比較画像と CFE（倍率×4、スケールバー：100μm）。

b）（1）～（3）の 3 次元培養のオルガノイド径の比較（1 元配置分散分析、多重比較法による）。

考　察

今回手術肺検体から分離した AT2 を使用し、より効率的な増殖がえられる 3 次元培養系を確立した。今後は、正常、COPD 肺組織から分離し、3 次元培養系で増殖させた AT2 を single-cell transcriptomic analysis を用いて検討し、病態進展に特異的に関与しうる AT2 cell cluster を同定し、AT2 の不均一性を評価することによって、蛋白恒常性維持機構、細胞老化、stemness などの違いを明らかにできる可能性があると考える。さらに AT2 培養系を用いて、細胞死や細胞老化に係る蛋白恒常性維持機構能異常とその役割を検討する。これら検討により、病態解明だけでなく、創薬につながるような重要な知見が得られる可能性があると考えている。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京慈恵会医科大学外科学講座呼吸器外科の大塚崇教授である

文　献

1） Kazushige Shiraishi, Takuya Nakajima, Shigeyuki Shichino, et al. In vitro expansion of endogenous human alvelolar epithelial type II cells in fibroblast-free spheroid culture. Biochem Biophys Res Commun. 2019 Aug 6;515(4):579-585. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31178143 DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.05.187

2） Ameen A Salahudeen, Shannon S Choi, Arjun Rustagi, et al. Progenitor identification and SARS-CoV-2 infection in human distal lung organoids. Nature. 2020 Dec;588(7839):670-675. Epub 2020 Nov 25. PMID: 33238290 DOI: 10.1038/s41586-020-3014-1

3） Hiroaki Katsura, Vishwaraj Sontake, Aleksandra Tata, et al. Human Lung Stem Cell- Based Alveolospheres Provide Insights into SARS-CoV-2-Mediated Interferon Responses and Pneumocyte Dysfunction. Cell Stem Cell. 2020 Dec 3;27(6):890-904.e8. Epub 2020 Oct 21. PMID: 33128895 DOI: 10.1016/j.stem.2020.10.005